Bioagro 26(1): 13-20. 2014

DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN POR qPCR DE *Colletotrichum lindemuthianum* EN TEJIDOS Y SEMILLAS DE FRIJOL EN ANTIOQUIA, COLOMBIA

Katherin Vanegas-Berrouet[1], Leonardo Martínez-Pacheco[2], Mauricio Salazar-Yepes[1], Pablo Gutiérrez-Sánchez[2] y Mauricio Marín-Montoya[2]

RESUMEN

La antracnosis del frijol causada por *Colletotrichum lindemuthianum*, es una de las enfermedades más limitantes de este cultivo. El patógeno se dispersa principalmente por semilla, por lo que la siembra de material certificado es fundamental para su manejo. La detección de *C. lindemuthianum* se basa en el uso de medios de cultivo y en los últimos años en técnicas de PCR; siendo la PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) una alternativa que ofrece altos niveles de especificidad, sensibilidad y rapidez. En este trabajo se evaluó dicha técnica utilizando los cebadores ClF432/ClR533 y el compuesto orgánico SYBR Green. Para esto se probó la especificidad de los cebadores a partir de ADN de micelio del hongo y de tejidos infectados de frijol (foliar y vainas), construyéndose una curva estándar basada en diluciones seriadas de ADN. Finalmente, se evaluó la presencia de *C. lindemuthianum* en muestras de semillas de frijol variedad Cargamanto comerciales y obtenidas directamente del campo. Las pruebas de qPCR detectaron *C. lindemuthianum* en las ocho muestras de micelio [Ciclo Umbral (Ct): 4,3-9,85] y en 17 de las 18 muestras de tejidos de frijol, independientemente de que éstas fueran o no sintomáticas (Ct: 16,71-29,38). El patógeno fue detectado en el 84 % del total de semillas evaluadas y en 85 % de las muestras comerciales, aunque la concentración de ADN del patógeno en estas últimas fue inferior que para las semillas no-comerciales (1-32,2 pg·μL^{-1} vs 1-279,3 pg·μL^{-1}). Estos resultados enfatizan la necesidad de fortalecer los programas de certificación de semilla de frijol en Colombia.

Palabras clave adicionales: Antracnosis, *Phaseolus vulgaris*, PCR en tiempo real, semilla

ABSTRACT

qPCR detection and quantification of *Colletotrichum lindemuthianum* in bean tissue and seeds from Antioquia, Colombia

Bean anthracnose, a disease caused by *Colletotrichum lindemuthianum*, is one of the most limiting factors for the bean crop. This pathogen is mainly transmitted from infected seeds making the use of certified seeds vital for its control. Detection of *C. lindemuthianum* is based on the use of culture media and, more recently, PCR techniques such as qPCR. The latter is one of the methods of choice due to its speed and high levels of specificity and sensibility. In this work, the SYBR Green qPCR technique was tested using primers ClF432/ClR533. Specificity was tested with DNA extracted from mycelia and infected plant tissues (leaves and pods) using a serially diluted DNA control sample as standard curve. The presence of *C. lindemuthianum* was also verified in commercial and non-commercial seed samples. qPCR detected *C. lindemuthianum* in eight mycelia samples tested [Threshold Cycle (Ct): 4.3-9.85] and 17 out 18 bean tissue samples (Ct: 16.71-29.38) regardless of the presence of symptoms. The pathogen was detected in 84 % of the whole set of tested seeds, and in 85 % of the commercial samples; however, the amount of DNA detected in the latter was lower than that for non-commercial seeds (1-32.2 pg·μL^{-1} vs. 1-279.3 pg·μL^{-1}). These results demonstrate the need of strengthening bean-seed certification programs in Colombia.

Additional key words: Anthracnose, *Phaseolus vulgaris*, real time PCR, seed

INTRODUCCIÓN

La antracnosis del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) causada p or *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magnus) Briosi & Cavara, es una de las enfermedades más limitantes de este cultivo en el mundo y en particular en las regiones andinas (Pastor-Corrales y Tu, 1989). Esta enfermedad

Recibido: Julio 29, 2013 Aceptado: Diciembre 20, 2013

[1] Museo Micológico Universidad Nacional de Colombia, MMUNM. Sede Medellín, Colombia. e-mail: kmvanega@unal.edu.co, masalazay@unal.edu.co

[2] Laboratorios de Microbiología Industrial y Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. Colombia. e-mail: saori1307@hotmail.com; paguties@unal.edu.co; mamarinm@unal.edu.co

puede ocasionar pérdidas en el rendimiento de los cultivos de frijol de hasta el 95 %, especialmente cuando se cultivan variedades susceptibles (Santana y Mahuku, 2002). El departamento de Antioquia es uno de los principales productores de frijol en Colombia, con cerca del 27 % del volumen nacional y representa la región del país con mayor consumo *per capita* de frijol (Arias et al., 2007).

Los síntomas que causa *C. lindemuthianum* en frijol incluyen lesiones carnosas oscuras en las vainas, que se transforman en chancros hundidos con centros de color salmón; además de necrosis en peciolos, venas y láminas foliares (Chaves, 1989). En los tallos se pueden presentar chancros que afectan la translocación de nutrientes en las plantas (Melotto et al., 2000). La enfermedad también puede ocasionar decoloración en las semillas, aunque es frecuente que estando infectadas, éstas se presenten como asintomáticas (Chen et al., 2013). Por esto un aspecto clave para el manejo de la antracnosis del frijol, es la siembra de semilla certificada libre de *C. lindemuthianum* (Schwartz et al., 2005). Tradicionalmente, la detección e identificación de *C. lindemuthianum* se ha fundamentado en su aislamiento en medios de cultivo y en la posterior observación de las estructuras morfológicas del patógeno, lo que requiere de experticia en taxonomía de hongos y entre 10 y 14 días de incubación de las colonias (Chen et al., 2007; 2013). Debido a estas limitaciones, en los últimos años se ha venido proponiendo para la detección de *C. lindemuthianum* el uso de técnicas basadas en PCR, tanto convencional (cPCR) como cuantitativa en tiempo real (qPCR), gracias a la disponibilidad de cebadores y sondas específicas para este hongo (Chen et al., 2007; 2013; Wang et al., 2008) y que permiten su diferenciación de las especies filogenéticamente cercanas *C. orbiculare* y *C. trifolii* (Liu et al., 2007; Cannon et al., 2012).

En este estudio se evaluó la utilidad de la técnica de qPCR bajo el sistema de SYBR Green, para detectar a *C. lindemuthianum* en tejidos de frijol variedad Cargamanto sintomáticos y asintomáticos, incluyendo semillas comerciales y obtenidas directamente de campos de agricultores del departamento de Antioquia (Colombia).

MATERIALES Y MÉTODOS

Inicialmente, se obtuvieron ocho aislamientos de *C. lindemuthianum* a partir de tejidos de folíolos y vainas de frijol con síntomas de antracnosis de los municipios de Abejorral, La Unión, Marinilla, Sonsón y Urrao. Los cultivos se realizaron en medio Papa Dextrosa Agar (PDA) suplementado con penicilina y tetraciclina (100 $mg \cdot L^{-1}$), confirmándose su identidad morfológica por microscopía óptica. Estos ocho aislamientos fueron empleados para validar la utilidad de los cebadores ClF432/ClR533 diseñados por Chen et al. (2013) para la detección de *C. lindemuthianum*. Posteriormente, se obtuvieron muestras de tejido foliar y de vainas con y sin síntomas de antracnosis de diferentes cultivos de frijol variedad Cargamanto del municipio de Carmen de Viboral, con el fin de definir la utilidad de esta prueba sobre el ADN total de tejido vegetal. Finalmente, se evaluó la qPCR en ADN procedente de tres lotes de 15 semillas de cultivos de frijol variedad Cargamanto en estado de cosecha del municipio de Carmen de Viboral; además de cuatro lotes (15 semillas c/u) de semillas de esta misma variedad, comercializadas por dos compañías de insumos agrícolas.

El ADN de los aislamientos de *C. lindemuthianum* fue extraído utilizando el método del CTAB 3X, descrito por Doyle y Doyle (1990) y modificado por Santa et al. (2012), a partir de micelio del hongo obtenido de medio líquido extracto de malta al 2 % (ME) durante 16-20 días. Este método de extracción también se utilizó para la extracción de ADN de semillas de frijol. El ADN de las muestras de tejido de frijol de folíolos y vainas se obtuvo con el producto comercial *DNeasy Plant Mini kit* (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. La integridad del ADN se determinó por electroforesis en gel de agarosa al 0,8 %, suplementado con bromuro de etidio (10 $mg \cdot mL^{-1}$), utilizando un equipo Bio Doc Analyze (Biometra). La concentración y pureza del ADN fue determinada por lecturas de absorbancia a 260 nm y 280 nm en un equipo Nanodrop 2000C (Thermo).

Una vez confirmada la identidad de los aislamientos de *C. lindemuthianum*, se evaluó la utilidad de los cebadores ClF432 (5′-GGA GCC TCC TTT GCG TAG TAA C-3′) y ClR533 (5′-ACC TGA TCC GAG GTC AAC CTT GTT-3′), diseñados por Chen et al. (2013), para amplificar mediante qPCR una porción de 101 pb de la región ITS del ADN ribosomal de este hongo. Para las reacciones de qPCR con SYBR Green se

utilizó el juego de reactivos Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (Fermentas), en 25 µL de reacción conteniendo 12,5 µL del juego, 10 µL de agua estéril libre de nucleasas, 0,3 µM de cada cebador y 50 nanogramos (ng) de ADN procedente tanto de micelio del hongo como de muestras de tejido foliar y de vainas de frijol. Las reacciones fueron realizadas en un equipo Rotor-Gene Q-5plex Platform (Qiagen) y consistieron de 95 °C por 10 min para activar la Taq-polimerasa (*Hot-start*), seguido por 40 ciclos de 95 °C por 15 s y 60 °C por 1 min. La adquisición de fluorescencia se realizó después de cada ciclo de amplificación y los valores de Ct para cada muestra fueron definidos utilizando los valores por defecto del programa Rotor-Gene Q ver. 1.7, siendo consideradas como positivas aquellas muestras que superaron el valor umbral antes del ciclo 40, siguiendo el criterio de Schena et al. (2004). Las eficiencias de las reacciones se calcularon con la fórmula $E = 10^{(-1/m)}$, donde E es la eficiencia de la amplificación y m la pendiente de la curva estándar generada a partir de diluciones seriadas en base 10, de ADN de *C. lindemuthianum*, cubriendo el rango de 1 pg a 1000 ng.

Una vez confirmada la utilidad de la técnica de qPCR, se procedió a evaluar la presencia de *C. lindemuthianum* en los siete lotes (15 semillas por lote) de semilla de frijol variedad Cargamanto. Las reacciones de qPCR se realizaron bajo las condiciones descritas anteriormente. Todos los ensayos presentaron un control negativo con agua destilada estéril y un control positivo consistente de ADN de uno de los aislamientos provenientes del municipio de Sonsón, previamente confirmado en el laboratorio como *C. lindemuthianum* por secuenciación de las regiones ITS del ADNr.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación inicial de qPCR: Los procedimientos de extracción utilizados en el estudio permitieron obtener ADN de buena calidad y en cantidades suficientes para las pruebas de qPCR. Así, para el caso del ADN obtenido de micelio del hongo por el método de CTAB 3X, se alcanzó un promedio de 762,9 ± 468,1 $ng \cdot \mu L^{-1}$ de ADN con una relación 260:280 nm de 1,68 ± 0,28, mientras que para el ADN de semillas, estos valores fueron de 2173 ± 1469 y 1,83 ± 0,18 $ng \cdot \mu L^{-1}$, respectivamente. Para el ADN de las muestras de tejido foliar y vainas de frijol extraídas con el producto comercial, dichos valores correspondieron en promedio a 85,6 ± 66,6 $ng \cdot \mu L^{-1}$ y relaciones 260:280 nm de 1,85 ± 0,15. Como se aprecia, existen diferencias notables entre las cantidades de ADN obtenidas con estos métodos, aunque las relaciones de absorbancia de 260:280 nm estuvieron dentro o muy cerca del rango óptimo de 1,7 a 2,0 señalado por Green y Sambrook (2012).

El análisis de las curvas fusión de las reacciones obtenidas por qPCR con los cebadores ClF432/ClR533, indicó que éstos generaban amplificaciones específicas con picos únicos entre 83,5 y 84 °C, tanto en muestras de micelio del hongo como en tejido foliar, vainas y semillas de frijol (Figura 1A). Estos resultados concuerdan con un trabajo anterior adelantado en nuestro laboratorio, en el que se evaluaron los cebadores en pruebas de cPCR para la detección de *C. lindemuthianum*, encontrándose que éstos generaban bandas únicas del tamaño esperado de 101 pb (Zuluaga et al., 2008). Por esto, las diferencias de hasta 0,5 °C determinadas en las temperaturas de fusión en este estudio, deben corresponder a mutaciones puntuales (transversiones y transiciones) e incluso *indels* normalmente presentes en las regiones ITS del ADNr de hongos, tal como ha sido reportado para diferentes especies de hongos.

Por otra parte, la curva estándar que se generó con base en diluciones seriadas de ADN de *C. lindemuthianum*, presentó la ecuación lineal Ct = -3,181 · Log [ADN] + 20,46, con un coeficiente de determinación (R^2) de 0,998 y una eficiencia de reacción de 106 %, valores éstos que validaron plenamente su utilidad para la detección y cuantificación de este hongo en el presente estudio, siendo el nivel mínimo de sensibilidad detectado por la prueba de 1 pg de ADN (Figura 1B). En este sentido, Scott (2006) reportó una comparación de eficiencias en reacciones optimizadas de qPCR para nueve diferentes equipos de PCR en tiempo real, encontrando un valor promedio de 103 % (94-128 %). En adición, Applied Biosystems (2011) en su manual técnico de qPCR, indica que una eficiencia aceptable para un experimento de qPCR debe presentarse entre 90 y 110 %, lo que confirma que la eficiencia obtenida en este trabajo se encuentra en el rango válido para dicha prueba.

Con respecto a los valores de Ct determinados en las reacciones que utilizaron ADN directamente de micelio del hongo, fue evidente la efectividad de la prueba de qPCR al presentarse muy bajos valores de Ct (4,81 a 9,85). En adición, las pruebas realizadas con ADN obtenido de tejido foliar y de vainas de frijol, demostraron que la qPCR con los cebadores ClF432/ClR533 detectó a *C. lindemuthianum* en 17 de las 18 muestras evaluadas, independientemente de que éstas procedieran de tejidos sintomáticos o asintomáticos; aunque fue notable que los valores de Ct fueron inferiores para aquellos tejidos con síntomas de antracnosis, al alcanzar valores de Ct en el rango de 21,89 a 29,38 para muestras asintomáticas y de 16,71 a 27,54 para las sintomáticas. Estas diferencias en los valores de Ct, se vieron reflejadas en las concentraciones estimadas con base en la curva estándar, que alcanzaron valores en el orden de picogramos (pg) para las muestras aparentemente sin antracnosis y de ng para aquellas sintomáticas, excepto para la muestra 16 cuyo valor fue de 6 pg·µL^{-1} (Cuadro 1). Interesantemente, una de las muestras de vaina aparentemente con síntomas de antracnosis (muestra 17) resultó repetidamente negativa en la prueba de qPCR, lo que supone un problema con la identificación de los síntomas causados por otra enfermedad o aun por desórdenes fisiológicos. Esto representa una razón adicional que justifica el uso de pruebas altamente específicas y sensibles como la qPCR para la detección e identificación de microorganismos fitopatógenos, tales como *C. lindemuthianum*. Finalmente, es importante anotar que en todas las reacciones evaluadas los controles negativos tuvieron valores de Ct superiores a 40 y los controles positivos se presentaron en el rango de Ct de 8,06 a 13,87.

Evaluación por qPCR de semillas: *C. lindemuthianum* fue detectado en los siete lotes de semilla evaluados en el estudio, incluyendo aquellos comercializados por compañías de agroinsumos en Antioquia. Para el caso de las semillas obtenidas directamente de cultivos de frijol, en dos de los lotes se detectó el hongo en 14 de las 15 muestras evaluadas, mientras que en el tercer lote, esto ocurrió para 9 de las 15 muestras. Los valores de Ct para dichas pruebas estuvieron entre 22,23 y 32,36 y las concentraciones estimadas de ADN del patógeno variaron de 1 a 279,3 pg·µL^{-1} (Cuadro 2). Por otra parte, en dos de los lotes de semillas comerciales se detectaron como infectadas por *C. lindemuthianum* a 11 de las 15 muestras evaluadas; mientras que en los otros dos lotes esto ocurrió para 14 y 15 semillas, respectivamente (Figura 1C). Los valores de Ct fueron levemente superiores a los obtenidos para las muestras de semillas de campo, al presentarse en el rango de 25,21 a 36,88, lo que representó concentraciones inferiores de ADN del patógeno (1 a 32,2 pg·µL^{-1}).

Cuadro 1. Detección por qPCR de *Colletotrichum lindemuthianum* en tejido foliar y de vainas de frijol variedad Cargamanto, en cultivos del departamento de Antioquia, Colombia

Muestra	Procedencia	Valor Ct	Concentración ADN pg·µL^{-1}
1	Folíolo asintomático	29,38	1,6
2	Folíolo asintomático	29,13	1,9
3	Vaina asintomática	22,07	311,8
4	Folíolo asintomático	27,44	6,4
5	Vaina asintomática	21,89	355,2
6	Vaina asintomática	27,48	6,2
7	Vaina asintomática	26,23	15,3
8	Vaina asintomática	26,86	9,7
9	Vaina asintomática	26,79	10,2
10	Vaina sintomática	19,07	2735,1
11	Vaina sintomática	16,71	15096,4
12	Folíolo sintomático	20,96	696,3
13	Vaina sintomática	19,26	2383,6
14	Vaina sintomática	18,51	4102,2
15	Vaina sintomática	19,62	1836,8
16	Folíolo sintomático	27,54	6,0
17	Vaina sintomática	>40	0,0
18	Vaina sintomática	21,32	536,6
C+	Aislamiento del hongo	13,87	117943,9
C-	Agua estéril	>40	0,0

En este estudio se validó la utilización de la técnica de qPCR con los cebadores ClF432/ClR533 (Chen et al., 2013), para la detección de genotipos de *C. lindemuthianum* procedentes de diferentes cultivos de frijol de Antioquia. La evaluación de cebadores y sondas diseñadas a partir de secuencias de aislamientos de microorganismos de otras regiones, es una condición fundamental para determinar la efectividad de las pruebas de diagnóstico molecular a todos los niveles, máxime para una situación como la de *C. lindemuthianum* en Antioquia, donde se ha encontrado la existencia de un gran nivel de variación patogénica de este hongo, siendo reportado por

Santana y Mahuku (2002), que 15 aislamientos de esta región evaluados sobre plantas diferenciales, representaban 11 razas diferentes.

Cuadro 2. Detección por qPCR de *Colletotrichum lindemuthianum* en semillas de frijol variedad Cargamanto obtenidas de cultivos de frijol en el departamento de Antioquia, Colombia, y de lotes comerciales de semillas

Lote de semillas	Muestras +/ Total	Rango de Ct	Rango de concentración ADN ($pg \cdot \mu L^{-1}$)
Campo 1	14/15	29,4-32,23	1-1,5
Control negativo		>40	0
Control positivo		11,13	$865,5 \cdot 10^3$
Campo 2	14/15	23,03-29,68	1,3-156,5
Control negativo		>40	0
Control positivo		11,13	$865,5 \cdot 10^3$
Campo 3	9/15	22,23-32,36	1-279,3
Control negativo		>40	0
Control positivo		11,71	$568,9 \cdot 10^3$
Comercial 1	11/15	25,4-36,88	1-28,2
Control negativo		>40	0
Control positivo		11,74	$554,4 \cdot 10^3$
Comercial 2	11/15	26-17-32,38	1-16,1
Control negativo		>40	0
Control positivo		11,74	$554,4 \cdot 10^3$
Comercial 3	15/15	26-32,97	1-18,3
Control negativo		>40	0
Control positivo		11,43	$629,9 \cdot 10^3$
Comercial 4	14/15	25,21-33,48	1-32,2
Control negativo		>40	0
Control positivo		10,84	$1062,9 \cdot 10^3$

Desafortunadamente, hasta el momento no se ha estimado el nivel de variación genotípica de las poblaciones de *C. lindemuthianum* en cultivos de frijol de Antioquia, por lo que sería de gran interés en el futuro la utilización de marcadores moleculares como AFLPs o microsatélites para tal fin, de manera que se defina sí existe una relación entre la variación de patotipos y la diversidad genética del hongo en dicha zona de Colombia. En este sentido, diferentes estudios han reportado muy altos niveles de diversidad genética en poblaciones de *C. lindemuthianum* de otros países, con valores HT de hasta 0,97 dentro de las regiones cultivadoras de frijol (Balardin et al., 1997; Gonzáles et al., 1998; Mahuku y Riascos, 2004; Damasceno e Silva et al., 2007).

C. lindemuthianum se dispersa principalmente por residuos de cosecha y semilla sexual (Melotto et al., 2000; Schwartz et al., 2005), siendo frecuente el hecho que el patógeno induzca infecciones latentes en semillas o de difícil diagnóstico en variedades de frijol coloreadas (ej. Cargamanto), al ser posible confundir los síntomas de antracnosis con los causados por otros patógenos o incluso por factores ambientales adversos que generan decoloraciones (Chaves, 1989). Por esto, el uso de semilla libre del patógeno y la certificación de la sanidad de los cultivos de plantas madre, son aspectos claves para el manejo de la antracnosis del frijol.

En nuestra investigación resultó evidente el hecho que la sanidad del material de siembra que se utiliza en Antioquia para el establecimiento de los cultivos de frijol variedad Cargamanto no es óptima, al encontrarse que en una alta proporción (84 %, es decir, 88 de 105 muestras) de los siete lotes de semilla fue detectado el ADN del patógeno. Una preocupación adicional merece el hecho que las semillas comerciales de frijol resultaron en alta proporción infectadas por *C. lindemuthianum* (85 %, es decir, 51 de 60 muestras), aunque fue evidente que la cantidad de ADN del hongo fue menor en éstas (1 a 32,2 $pg \cdot \mu L^{-1}$) que en aquellas obtenidas directamente de campos de agricultores (1 a 279,3 $pg \cdot \mu L^{-1}$). Sin embargo, desde el punto de vista epidemiológico, la presencia de inóculo primario del patógeno en semilla, aún en bajas concentraciones o porcentajes de incidencia, es suficiente para afectar los rendimientos de los cultivos de frijol. Así por ejemplo, Conner et al. (2004) reportaron en un estudio de campo, que un nivel de infección de *C. lindemuthianum* en tan sólo el 7% de las semillas, resultó en pérdidas del 15 a 32% en la variedad de frijol Navigator. En adición, Chen et al. (2013) encontraron una buena correlación entre el tamaño de las lesiones de antracnosis presentes en semillas al final del cultivo y la cantidad del patógeno determinada por qPCR en las semillas plantadas.

Por otra parte, un aspecto destacable del presente estudio fue el alto nivel de sensibilidad alcanzado por la prueba de qPCR, siendo posible la detección de hasta de 1 pg de ADN en material vegetal de frijol (folíolos, vainas y semillas), lo que claramente supera la posibilidad de detección del patógeno por sintomatología en el campo y/o por su aislamiento en medios de cultivo. Diferentes estudios han revelado que la técnica de qPCR ofrece niveles de sensibilidad superiores en 100 a 1000 veces con respecto a la cPCR, lo que se ha atribuido al hecho que la detección del ADN

se realiza en las primeras fases de los ciclos en la qPCR y no en la etapa final de las reacciones como ocurre en la cPCR; además al utilizarse en los equipos de tiempo real potentes detectores de fluorescencia, se evitan los problemas de subjetividad en la visualización de los amplicones, propios de las corridas electroforéticas convencionales (Schena et al., 2004; García et al., 2013).

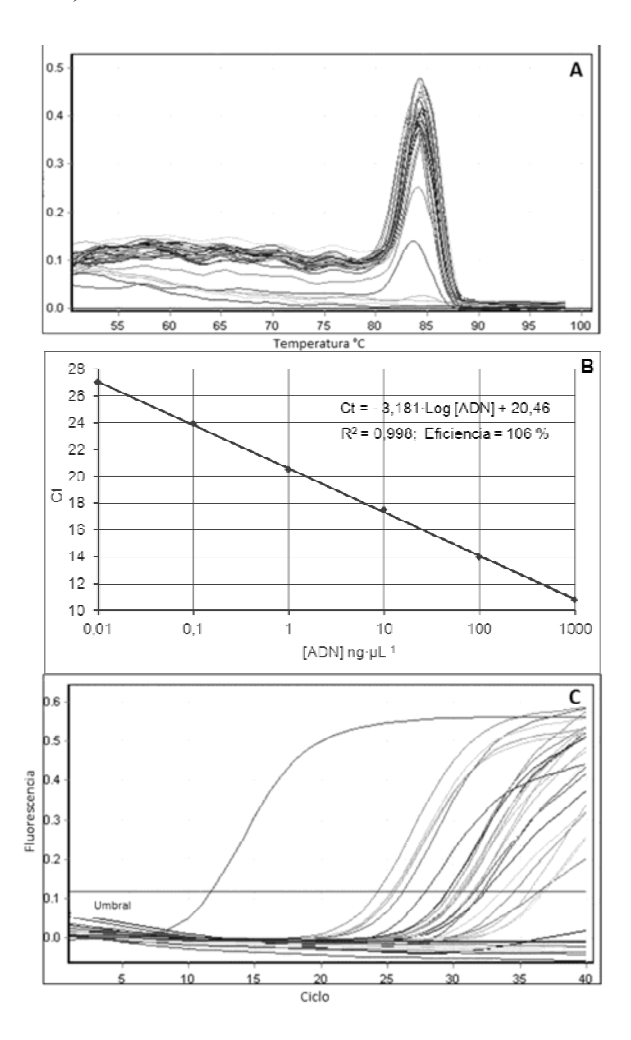


Figura 1. A. Perfiles de la curva de fusión de amplicones específicos de *Colletotrichum lindemuthianum* obtenidos por qPCR. B. Curva estándar construida con la prueba de qPCR para la cuantificación de ADN de *C. lindemuthianum*. C. Curvas de amplificación por qPCR utilizando el sistema SYBR Green y los cebadores ClF432/ClR533 para la detección de *C. lindemuthianum* en semillas comerciales de frijol variedad Cargamanto en Antioquia, Colombia

Se espera que los resultados obtenidos en esta investigación sirvan de base para fortalecer los programas de certificación de semilla de frijol en Colombia y otros países andinos, en los que la antracnosis resulta especialmente limitante para la producción de este cultivo. Por esto es deseable que los organismos de sanidad vegetal estatal, gremios de agricultores y compañías de semillas, incorporen la metodología de qPCR aquí evaluada como parte de sus procedimientos para garantizar la sanidad del material de siembra y en general de los cultivos de frijol.

CONCLUSIONES

Se evaluó la utilidad de la técnica de qPCR bajo el sistema SYBR Green y con los cebadores ClF432/ClR533 para la detección de *C. lindemuthianum* en tejido foliar, de vainas y semillas de frijol variedad Cargamanto en cultivos del departamento de Antioquia (Colombia). Los resultados indicaron la efectividad de esta prueba al alcanzarse niveles de sensibilidad de hasta 1 pg de ADN del hongo y altas eficiencias de reacción.

De un total de 105 semillas evaluadas en el estudio y procedentes tanto directamente de cultivos como de material de siembra comercializado en Antioquia (Colombia), se detectó ADN de *C. lindemuthianum* en el 84% de éstas, lo que refleja la necesidad de fortalecer los programas de certificación de semilla de frijol en el país, máxime cuando este patógeno es eficientemente dispersado por este medio, dentro y entre diferentes regiones de cultivo.

AGRADECIMIENTO

A la Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad Nacional de Colombia, por el financiamiento del proyecto 20101009932, Convocatoria Nacional para el fortalecimiento de los Grupos de Investigación y Creación Artística de la Universidad Nacional de Colombia. 2010-2012.

LITERATURA CITADA

1. Applied Biosystems. 2011. Application Note: Real-time PCR. http://www.invitrogen.com/etc/medialib/ (consulta del 15/07/2013).
2. Arias, J., T. Rengifo y M. Jaramillo. 2007.

Manual Técnico: Buenas Prácticas Agrícolas en la Producción de Fríjol Voluble. FAO, Medellín. 198 p.

3. Balardin, R., A. Jarosz y J. Kelly. 1997. Virulence and molecular diversity in *Colletotrichum lindemuthianum* from South, Central, and North America. Phytopathology 87: 1184-1191.
4. Cannon, P., U. Damm, P. Johnston y B. Weir. 2012. *Colletotrichum* -current status and future directions. Studies in Mycology 73:181-213.
5. Chaves, G. 1989. Anthracnose. *In*: H. Schwartz y G. Galvez (eds.). Bean Production Problems. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia. pp. 39-54.
6. Chen, Y., R. Conner, C. Gillard, G. Boland, C. Babcock, K. Chang, S. Hwang y P. Balasubramanian. 2007. A specific and sensitive method for the detection of *Colletotrichum lindemuthianum* in dry bean tissue. Plant Disease 91: 1271-1276.
7. Chen, Y., R. Conner, C. Gillard, D. McLaren, G. Boland, P. Balasubramanian, C. Stasolla, Q. Zhou, S. Hwang, K. Chang y C. Babcock. 2013. A quantitative real-time PCR assay for detection of *Colletotrichum lindemuthianum* in navy bean seeds. Plant Pathology 62: 900-907.
8. Conner, R., D. McAndrew, F. Kiehn, S. Chapman y N. Froese. 2004. Effect of foliar fungicide application timing on the control of bean anthracnose in the navy bean 'Navigator'. Canadian Journal of Plant Pathology 26: 299-303.
9. Damasceno e Silva, K., E. de Souza y F. Ishikawa. 2007. Characterization of *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from the state of Minas Gerais, Brazil. Journal of Phytopathology 155: 241-247.
10. Doyle, J. y J. Doyle, 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12:13-15.
11. García, N., J. Morales, P. González, P. Gutiérrez y M. Marín. 2013. Detección y cuantificación de *Spongospora subterranea* f.sp. *subterranea* en plantas señuelo y cultivos de papa en Colombia mediante qPCR. Acta Biológica Colombiana 18: 121-136.
12. Gonzáles, M., R. Rodríguez, M. Zavala, J. Jacobo, F. Hernazed, J. Acosta, O. Martínez y J. Simpson. 1998. Characterization of Mexican isolates of *Colletotrichum lindemuthianum* by using differential cultivars and molecular markers. Phytopathology 88: 292-299.
13. Green, M. y J. Sambrook. 2012. Molecular Cloning: A laboratory Manual. 4th edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
14. Liu, B., L. Walsiwa, T. Morelock, N. O'Neill y J.C. Carrell. 2007. Comparison of *Colletotrichum orbiculare* and several allied *Colletotrichum* spp. for mtDNA RFLPs, intron RFLP and sequence variation, vegetative compatibility, and host specificity. Phytopathology 97: 1305-1314.
15. Mahuku, S. y J. Riascos. 2004. Virulence and molecular diversity within *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from Andean and Mesoamerican bean varieties and regions. European Journal of Plant Pathology 110: 253-263.
16. Melotto, M., R. Balardin y J. Kelly. 2000. Host-pathogen interaction and variability of *Colletotrichum lindemuthianum*. *In*: D. Prusky, S. Freeman y M.B. Dickman (eds.). Host specificity, pathology and host-pathogen interactions of *Colletotrichum*. APS Press. St Paul, MN. pp. 346-361.
17. Pastor-Corrales, M. y J. Tu. 1989. Anthracnose. *In*: H. Schwartz y G. Galvez (eds.). Bean Production Problems. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali. Colombia. pp. 77-104.
18. Santa, C., M. Marín y M. Díez. 2012. Identificación del agente causal de la pudrición basal del tallo de vainilla en cultivos bajo cobertizos en Colombia. Revista Mexicana de Micología 35: 23-34.
19. Santana, E. y G. Mahuku. 2002. Diversidad de razas de *Colletotrichum lindemuthianum* en Antioquia y evaluación de germoplasma de frijol crema-rojo por resistencia a antracnosis. Agronomía Mesoamericana 13: 95-103.
20. Schena, L., F. Nigro, A. Ippolito y D. Gallitelli. 2004. Real-time quantitative PCR: a new technology to detect and study phytopathogenic and antagonistic fungi. European Journal of Plant Pathology 10: 893-908.
21. Schwartz, H.F., J.R. Steadman, R. Hall y R.L.

Forster. 2005. Compendium of Bean Diseases. APS Press. St Paul, MN. 109 p.

22. Scott, P. 2006. Data analysis and reporting. *In:* M. Tevfik Dorak (ed.). Real-time PCR. Taylor & Francis. New York. pp. 39-61.

23. Wang, W., J. Tang y Y. Wang. 2008. Molecular detection of *Colletotrichum lindemuthianum* by Duplex PCR. Journal of Phytopathology 156: 431-437.

24. Zuluaga, C., P. Buriticá y M. Marín. 2008. Generalidades de los Uredinales (Fungi: Basidiomycota) y de sus relaciones filogenéticas. Acta Biológica Colombiana. 14:41-56.